

ВЛИЯНИЕ ФОТОТЕРАПИИ И СИСТЕМНОЙ ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ НА ЭКСПРЕССИЮ Ki-67, P53 И GLUT-1 ПРИ ПСОРИАЗЕ

Новиков Ю.А.^{1,2}, Охлопков В.А.³, Полещук Е.И.^{1,2}, Мозговой С.И.¹, Трошина Д.С.¹, Зыкова Е.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, e-mail: skinandven@omsk-osma.ru;

²БУЗ Омской области «Клинический кожно-венерологический диспансер», Омск, e-mail: oookvd_mail@minzdrav.omskportal.ru;

³Медицинская Академия АО ГК «Медси», Москва, e-mail: medacademia@medsigroup.ru

В статье представлены результаты исследования, имеющего задачи проведения оценки клинической эффективности фототерапии и системной терапии метотрексатом, изучения изменения параметров клеточного обновления эпителия псориатической папулы и проведения анализа эффективности и безопасности проводимой терапии на основании клинико-морфологических сопоставлений. В группу больных псориазом, получавших фотохимиотерапию, вошли 87 пациентов; в группу больных, получавших узкополосную 311 нм фототерапию, — 58 человек и в группу пациентов, получавших системную терапию метотрексатом, — 59 больных. Для проведения иммуногистохимического исследования с определением уровня экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 произведен забор биоптатов кожи с пораженных участков до начала лечения и на 21-й день терапии. В качестве контроля использованы биоптаты здоровой кожи пациентов, взятые во время проведения пластических операций. Выраженный клинический эффект Δ PASI \geq 75 отмечался у большинства пациентов во всех группах: у 77 (88,5%) больных первой группы, у 54 (93%) больных второй группы и у 39 (66%) больных третьей группы. При иммуногистохимическом исследовании установлено статистически значимое повышение исходных показателей уровня экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 у всех больных псориазом в сравнении с контрольной группой. В ходе проводимой терапии отмечается достоверное снижение иммунореактивности Ki-67 и GLUT-1. В ответ на терапию у больных отмечается как понижение, так и повышение уровня экспрессии P53. Фототерапия и системная терапия метотрексатом являются безопасными методами лечения и обладают высокой терапевтической эффективностью. Оценка уровня экспрессии GLUT-1 при псориазе может рассматриваться в качестве дополнительного критерия определения тяжести патологического процесса и эффективности проводимой терапии. Предложенная методика оценки эффективности проводимой терапии при псориазе с помощью маркеров клеточного обновления (Ki-67, P53, GLUT-1) является удобной и может использоваться в практике.

Ключевые слова: псориаз, фототерапия, метотрексат, P53, Ki-67, GLUT-1, эффективность, безопасность.

IMPACT OF PHOTO- AND SYSTEMIC METHOTREXATE THERAPY ON Ki-67, P53 AND GLUT-1 EXPRESSION IN PSORIASIS

Novikov Yu.A.^{1,2}, Okhlopkov V.A.³, Poleschuk E.I.^{1,2}, Mozgovoi S.I.¹, Troshina D.S.¹, Zyкова E.A.¹

¹Omsk State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Omsk, e-mail: skinandven@omsk-osma.ru;

²Omsk Clinical Dermatology and Sexual Health Hospital, Omsk, e-mail: oookvd_mail@minzdrav.omskportal.ru;

³Medical Academy «Medsia», Moscow, e-mail: medacademia@medsigroup.ru

The article presents the results of the study aimed at the assessment of the clinical efficacy of photo- and systemic methotrexate therapy, the investigation of the cellular epithelium renewal parameter changes in a psoriatic papule and the analysis of therapy efficacy and safety based on clinical and morphological comparisons. 87 patients with psoriasis were included into the group receiving photochemotherapy; 58 patients were in the group receiving 311 nm narrow-band phototherapy and 59 patients were in the group under systemic methotrexate therapy. Skin biopsy samples were taken from the liaisons before treatment and on the 21st day of therapy for immunohistochemical tests to determine the expression of Ki-67, P53 and GLUT-1. Healthy skin biopsies were taken during plastic surgeries and used as the control samples. A significant clinical effect of Δ PASI \geq 75 was registered in most patients in all groups: in 77 (88.5%) patients of the 1st group, 54 (93%) of patients in the 2nd group and in 39 (66%) patients of the 3rd group. A statistically significant increase of basic expression parameters of Ki-67, P53 and GLUT-1 in all patients with psoriasis compared with the control group was found in immunohistochemical study. During therapy Ki-67 and GLUT-1 immunoreactivity evident decrease was recorded. As a response to the conducted therapy both a decrease and an increase of P53 expression were

determined in patients. Photo- and systemic methotrexate therapy are safety treatment modes with high therapeutic efficacy. Assessment of GLUT-1 expression in psoriasis can be considered as an additional criterion to determine the severity of the disease and the efficacy of the conducted therapy. The methodology proposed for efficacy assessment of ongoing therapy in psoriasis using cell renewal markers (Ki-67, P53, GLUT-1) is convenient and can be used in practice.

Keywords: psoriasis, phototherapy, methotrexate, P53, Ki-67, GLUT-1, efficacy, safety.

Псориаз является хроническим гиперпролиферативным воспалительным заболеванием кожи. Поэтому существует повышенный риск возникновения злокачественных новообразований кожи у больных псориазом при длительном использовании иммуносупрессивной терапии [1, 2]. Псориаз и любые опухоли имеют общие проявления, такие как чрезмерная пролиферация клеток, неоангиогенез и наличие местной гипоксии [3, 4].

Несмотря на эпоху новых биологических агентов, у больных со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза фототерапия и системная терапия метотрексатом являются не только наиболее доступными и эффективными методами лечения [2, 5], но и терапевтическими средствами первой линии в лечении пациентов с данным дерматозом [6].

Отдаленным побочным эффектом фототерапии является риск канцерогенеза, причиной которого служит воздействие ультрафиолетового облучения на генетический аппарат клетки. В результате могут нарушаться синтез нуклеиновых кислот и возникать мутации клеточной ДНК [2, 5].

Длительное применение системной терапии метотрексатом характеризуется кумулятивным токсическим воздействием на организм и сопряжено с подавлением иммунитета. Системная иммуносупрессия может способствовать росту кожного рака, индуцированного ультрафиолетовым облучением или другими канцерогенными агентами [2].

Эффективность и безопасность являются важными аспектами при выборе метода лечения у больных псориазом.

Для оценки эффективности и безопасности проводимой терапии мы выбрали универсальный маркер клеточной пролиферации Ki-67 и маркер повреждения ДНК P53 [7, 8].

Преыдушие исследования показали, что в опухолевых тканях при псориазе, а также при заживлении ран отмечается повышенная экспрессия GLUT-1 [4, 9, 10].

Повышенная экспрессия белка – транспортера GLUT-1 при онкологических процессах является прогностически неблагоприятным признаком, связана с прогрессированием опухоли, характеризуется наличием метастазов в лимфатических узлах, рецидивами, резистентностью к проводимой терапии и низкой выживаемостью больных [11, 12].

Повышение активности GLUT-1 облегчает метаболизм глюкозы, что необходимо для гиперпролиферирующих клеток, поддерживает воспаление и способствует ангиогенезу [13]. Оценка уровня синтеза в клетках этого белка может являться одним из критериев эффективности проводимой терапии. Все это послужило поводом для настоящего исследования.

Цель исследования: совершенствование методики оценки эффективности и безопасности фототерапии и системной терапии метотрексатом у больных псориазом на основе маркеров клеточного обновления и маркера белка – переносчика глюкозы в клетку GLUT-1.

Материал и методы исследования. Для достижения поставленной цели нами были изучены особенности клеточного обновления эпителия псориазической папулы, а также дана оценка эффективности и безопасности проводимой терапии (фототерапии и системной терапии метотрексатом) на основании клинико-морфологических сопоставлений.

Под наблюдением были 204 пациента, получавших фототерапию и системную терапию метотрексатом, со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза, находящихся на стационарном лечении в БУЗ Омской области «ККВД».

Критерии включения: возраст старше 18 лет, добровольное информированное согласие на участие в исследовании, диагноз «Псориаз вульгарный, прогрессирующая стадия (L40.0)», индекс PASI более 10%. Протокол исследования был одобрен локальным научным этическим комитетом ОмГМУ.

Фотохимиотерапия проводилась с использованием ультрафиолетовой кабины Waldmann UV 7002K и ламп F79/120W-PUVA, генерирующих излучение в диапазоне волн 320–410 нм с максимальной эмиссией на длине 365 нм. За два часа до сеанса пациенты принимали аммифурин 1 мг/кг (производитель «Фармцентр ВИЛАР», регистрационное удостоверение ЛС-002598). Сеансы фототерапии проводили 4 раза в неделю. Начальная доза ультрафиолетового излучения составляла 0,5–1,0 Дж/см² с последующим повышением дозы на 0,5–1,0 Дж/см². На курс 15–20 процедур с достижением курсовой дозы облучения 76–84 Дж/см².

Узкополосная терапия 311 нм проводилась 4 раза в неделю с использованием фотокабины Waldmann UV 7002K и ламп F79/120W-TL01, генерирующих излучение в диапазоне волн 310–315 нм с максимальной эмиссией на длине волны 311 нм. Начальная доза ультрафиолетового излучения составляла 0,05–0,1 Дж/см² с последующим повышением дозы на 0,05–0,1 Дж/см². На курс 15–20 процедур с достижением курсовой дозы облучения 7,2–8,45 Дж/см².

Начальные дозы облучения устанавливали с учетом фототипа кожи, который определяли до начала проведения фототерапии (Владимиров В.В., 2009).

Метотрексат пациенты получали в дозе 7,5–25 мг в неделю. За период стационарного лечения суммарная доза метотрексата составила 22,5–75 мг. В соответствии с протоколом исследования все участники, получавшие метотрексат, через 24 часа принимали внутрь 5 мг фолиевой кислоты однократно.

Для проведения иммуногистохимического исследования произведен забор биоптатов кожи с пораженных участков у 45 пациентов до начала лечения и на 21-й день терапии, в каждой группе у 15.

Группу сравнения составили 18 добровольцев, не имеющих клинических признаков заболеваний кожи, обратившихся в клинику по поводу косметологической коррекции. После получения их письменного согласия от этих лиц были получены биоптаты кожи.

Клиническая эффективность проводимой терапии оценивалась на основании определения динамики дерматологического индекса охвата и тяжести псориаза PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Изменение величины индекса PASI в процессе лечения (Δ PASI) рассчитывали в процентах, при этом выраженный терапевтический эффект констатировался при Δ PASI \geq 75%, а при значениях Δ PASI < 75% терапевтический эффект расценивали как незначительный или частичный [5, 6].

Имуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах с использованием предметных стекол с поли-L-лизиновым адгезивным покрытием (Thermo Scientific, США). Демаскировку антигенов проводили в цитратном буфере (pH=6,0) при кипячении на водяной бане в течение 1 часа. В качестве первичных антител (табл. 1) использовали готовые к применению не требующие разведения (RTU – ready to use) кроличьи моноклональные антитела (Spring Bioscience, США). Для визуализации результатов иммуногистохимической реакции применяли набор детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, США). В качестве хромогена использовался 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорид, входящий в коммерческий набор детекции. Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера в течение 30 секунд – 2 минут.

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на микроскопе Axioskop 40 с использованием камеры AxioCam 503c и программного комплекса ZEN.

Таблица 1

Панель антител, использованных в работе

Антитела	Клон	Природа, биологическая роль, функции белка, интерпретация	
Ki-67	SP-6	Ядерный негистоновый белок, маркер	RTU

		пролиферации	
P53	SPM 514	Продукт антионкогена <i>p53</i> , ядерный фактор транскрипции, маркер повреждения ДНК	RTU
GLUT-1	SP168	Белок – переносчик глюкозы в клетку, маркер метаболической активности клетки	RTU

При 400-кратном увеличении микроскопа определяли индекс пролиферации Ki-67 и индекс повреждения ДНК P53 как долю (в %) положительно окрашенных ядер эпидермоцитов в 10 случайно выбранных полях зрения (≥ 1000 клеток).

Любое количество клеток с мембранной или цитоплазматической картиной окраски клеточных структур антителами к GLUT-1 оценивалось как положительная экспрессия.

Для оценки экспрессии белка – переносчика глюкозы согласно рекомендациям учитывались локализация, интенсивность окрашивания, распространенность и вариант окраски клеточных структур [4, 9, 10]. Каждому показателю присваивался балл от 0 до 3. Для подсчета индекса экспрессии GLUT-1 полученные баллы суммировались. При этом максимальное значение индекса экспрессии составило 12 баллов, а минимальное – 0.

Статистическая обработка данных проводилась на основании современных методических подходов [14, 15, 16] с использованием пакета Statistica 6.1, Microsoft Office Excel 2007. Проверку нормальности распределения количественных параметров осуществляли с помощью критериев Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Описательная статистика количественных признаков проводилась методом перцентилей с использованием показателей медианы (P50), минимума (P0) и максимума (P100) и среднеквадратических отклонений (в формате $M \pm SD$). Для оценки связей применялся метод ранговой корреляции Кендалла с расчетом коэффициента корреляции t и уровня статистической значимости p . Для сравнения количественных показателей двух независимых групп использован U -критерий Манна–Уитни, двух зависимых групп – T -критерий Вилкоксона, трех независимых групп – H -критерий Краскела–Уоллиса. В исследовании результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$, значения уровня значимости приведены в виде $p = 0,000 \dots$

Результаты исследования и их обсуждение. Для оценки клинической эффективности проводимой терапии в открытом контролируемом проспективном когортном исследовании больные псориазом были разделены на три группы: первая ($n=87$) – больные в возрасте от 18 до 63 лет, получавшие фотохимиотерапию; из них 68 мужчин и 19 женщин с индексом PASI от 10,8 до 46,8% и давностью заболевания от 1 года до 42 лет; вторая ($n=58$) – больные в возрасте от 18 до 65 лет, получавшие узкополосную фототерапию 311 нм; из них 44 мужчины и 14 женщин с индексом PASI от 10,2 до 32% и давностью заболевания от 1 года

до 47 лет; третья (n=59) – больные в возрасте от 18 до 65 лет, получавшие системную терапию метотрексатом; из них 14 женщин и 45 мужчин с индексом PASI от 10 до 44,4% и давностью заболевания от 1 года до 52 лет.

По фототипам кожи больные распределились следующим образом: в первой группе II фототип имели 51 (59%) больных, III фототип имели 36 (41%) больных; во второй группе II фототип имели 45 (78%) больных, III фототип имели 13 (22%) больных и в третьей группе II фототип имели 36 (61%) больных, III фототип имели 23 (39%) больных.

Все пациенты получали комплексное лечение, включающее: антигистаминные препараты, седативные, десенсибилизирующие средства, витамины и наружную терапию.

Установлено статистически значимое различие диагностического индекса PASI (%) до и после лечения: после курса фотохимиотерапии в среднем по медиане 20,5 и 2,4% (T = 0,00, p=0,000); после проведенной узкополосной 311 нм фототерапии в среднем по медиане 11,9 и 1,2% (T = 0,00, p=0,000); после системной терапии метотрексатом в среднем по медиане 15,8 и 3,0% (T = 0,00, p=0,000).

Эффективность проводимой терапии во всех группах была высокой: после курса фотохимиотерапии у больных первой группы Δ PASI (M \pm SD) составило 88,5 \pm 13,6%, после проведенной узкополосной фототерапии 311 нм терапии у больных второй группы – 92,1 \pm 10,3%, после системной терапии метотрексатом – 81 \pm 9,6%. Выраженный клинический эффект Δ PASI \geq 75 отмечался у 77 (88,5%) из 87 больных первой группы, у 54 (93%) из 58 больных второй группы и у 39 (66%) из 59 больных третьей группы. Недостаточный эффект от терапии Δ PASI < 75 наблюдался в первой группе у 11,5%, во второй – у 7% и в третьей – у 34% больных.

В начале нашего исследования были определены показатели уровня экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 в биоптатах кожи больных контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Показатели экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 в группе контроля (n=18)

Показатели	Min	P25	P50	P75	Max	SD
Ki-67 (%)	3,3	3,6	5,3	6,3	8,5	1,61
P53 (%)	0	0	0	0,2	0,2	0,10
GLUT-1 (балл)	0	5	6	6	6	1,92

Как видно из таблицы 2, минимальные значения индекса пролиферации в коже здоровых людей составляют 3,3%, максимальные – 8,5%, в среднем по медиане – 5,3%. Обнаружение экспрессии Ki-67 в биоптатах контрольной группы свидетельствует об активности процессов обновления кератиноцитов в нормальной коже. По данным литературных источников уровень экспрессии маркера пролиферации Ki-67 варьирует от 0

до 10% [7, 8]. Следовательно, наши результаты совпадают с данными литературы. Ki-67 позитивные клетки наблюдались преимущественно в базальном слое эпидермиса.

Изучение экспрессии маркера повреждения ДНК P53 в эпидермисе в процессе иммуногистохимического исследования выявило его низкий уровень, вариабельность показателей составляет от 0 до 0,2%, в среднем по медиане – 0%. Присутствие в коже здоровых пациентов белка P53 свидетельствует о его защитной роли для сохранения гомеостаза в ответ на пролиферацию клеток. Известно, что дикий тип P53 подавляет экспрессию GLUT-1, что приводит к снижению метаболизма глюкозы и тормозит пролиферацию клеток [12, 17]. P53 позитивные клетки наблюдались в базальном и шиповатом слоях эпидермиса. В литературе есть данные, что экспрессия белка P53 в эпидермисе здоровой кожи может достигать 10% [7].

Особый интерес представлял маркер метаболической активности GLUT-1, так как в литературных источниках есть сведения о том, что в коже здоровых людей его экспрессия или слабо выражена, или не наблюдается совсем [4, 10]. Однако мы предположили, что GLUT-1 должен присутствовать в здоровом эпидермисе, так как кератиноциты входят в число клеток, которые поглощают большое количество глюкозы для поддержания гомеостаза кожи [18]. Наша гипотеза подтвердилась, мы обнаружили слабую экспрессию GLUT-1 в базальном и шиповатом слоях эпидермиса. В коже здоровых людей экспрессия GLUT-1 варьирует от 0 до 6 баллов, в среднем по медиане составляет 6 баллов.

На рисунке 1 представлена экспрессия Ki-67, P53 и GLUT-1 в коже здоровых людей и у больных псориазом до лечения и на 21-й день терапии.

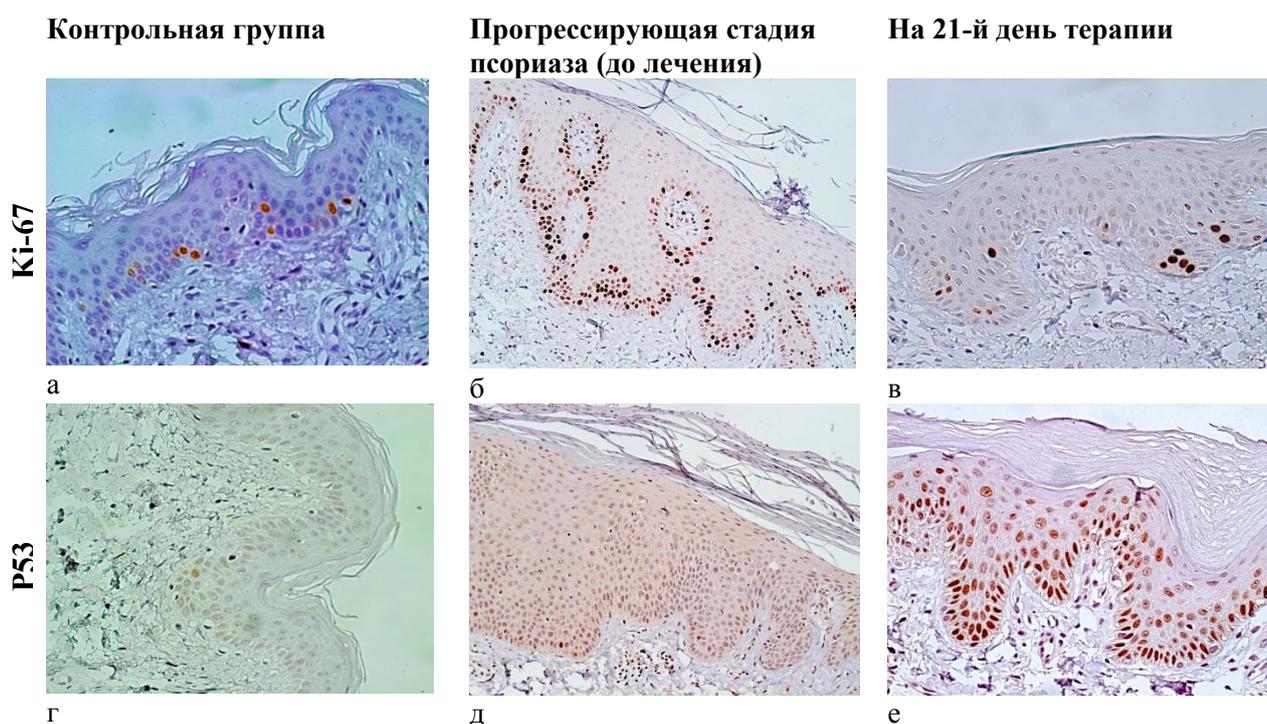




Рис. 1. Экспрессия Ki-67, P53, GLUT-1 в эпидермисе больных псориазом и в контрольной группе (а – экспрессия Ki-67 в эпидермисе контрольной группы; б – экспрессия Ki-67 у больных псориазом до терапии; в – экспрессия Ki-67 на 21-й день терапии; г – экспрессия P53 в эпидермисе контрольной группы; д – экспрессия P53 у больных псориазом до терапии; е – экспрессия P53 на 21-й день терапии; ж – экспрессия GLUT-1 в эпидермисе контрольной группы; з – экспрессия GLUT-1 у больных псориазом до терапии; и – экспрессия GLUT-1 на 21-й день терапии)

На следующем этапе нашего исследования мы изучили влияние фототерапии и системной терапии метотрексатом на динамику показателей экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 в биоптатах кожи больных псориазом. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка экспрессии Ki-67, P53 и GLUT-1 в коже больных псориазом в ходе проводимой терапии

Показатели	Фотохимиотерапия			Узкополосная 311 нм фототерапия			Метотрексат		
	До	После	T, p	До	После	T, p	До	После	T, p
Ki-67(%) Min-Max	10,3–53,8	0,0–11,9	T=0,0 p=0,000	15–51,8	9,4–28,8	T=4,0 p=0,001	14,5–58,2	5,7–38,9	T=0,00 p=0,000
Ki-67(%) Медиана	26,0	4,8		34,5	18,3		41,9	13,6	
P53(%) Min-Max	0,2–1,6	0,0–87,5	T=3,0 p=0,001	0,3–2,4	1,5–8,3	T=0,00 p=0,000	0,8–4,5	1,1–8,2	T=5,0 p=0,001
P53(%) Медиана	0,9	52,5		1,2	3,7		1,4	4,0	
GLUT-1 (балл) Min-Max	10–11	4–10	T=0,00 p=0,000	9–11	6–10	T=0,00 p=0,000	9–11	8–10	T=0,00 p=0,002
GLUT-1 (балл) Медиана	11	8		10	8		10	9	

Примечание: T-критерий Вилкоксона, p – уровень статистической значимости

Мы обнаружили повышенную экспрессию маркера пролиферации Ki-67 в базальном и супрабазальных слоях эпидермиса у больных псориазом в прогрессирующую стадию заболевания до лечения и на 21-й день терапии.

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов пораженной кожи с использованием U-критерия Манна–Уитни было установлено статистически значимое повышение исходных показателей индекса пролиферации Ki-67 в среднем по медиане у всех больных псориазом в сравнении с контрольной группой: в первой группе – 26,0 и 5,3% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$), во второй – 34,5 и 5,3% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$), в третьей – 41,9% и 5,3% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$). Высокий уровень экспрессии Ki-67 указывает на повышенную пролиферативную активность кератиноцитов, характерную для прогрессирующей стадии псориаза. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований [1, 7, 8].

Как видно из таблицы 3, при сравнении количественных показателей двух зависимых групп с использованием T-критерия Вилкоксона установлено достоверное снижение показателей индекса пролиферации Ki-67 в среднем по медиане в сравнении с исходными значениями: в первой группе 26,0% и 4,8% ($T=0,0$; $p=0,000$), во второй 34,5% и 18,3% ($T=4,0$; $p=0,001$), в третьей 41,9% и 13,6% ($T=0,00$; $p=0,000$). Понижение индекса экспрессии Ki-67 указывает на снижение роста эпидермоцитов. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности проводимой фототерапии и системной терапии метотрексатом и согласуются с данными других авторов [1, 7, 8].

С использованием H-критерия Краскела–Уоллиса максимальные значения индекса пролиферации (58,2%) до лечения выявлены в группе больных, получавших системную терапию метотрексатом, а минимальные (10,3%) – в группе больных, получавших фотохимиотерапию ($H=5,46$; $p=0,065$). Наименьшая вариабельность показателей индекса пролиферации Ki-67 отмечена в группе больных, получавших узкополосную фототерапию 311 нм (от 15,0 до 51,8%), наибольшая – в группах, получавших фотохимиотерапию (от 10,3 до 53,8%) и системную терапию метотрексатом (14,5–58,2%). В среднем по медиане экспрессия Ki-67 после лечения составляет в первой группе 4,8%, во второй 18,3% и в третьей 13,6% ($H=22,34$; $p=0,000$). Максимальные значения отмечены в группе больных, получавших системную терапию метотрексатом (38,9%), минимальные – в группе больных, получавших фотохимиотерапию (0,00%). Наименьший размах показателей установлен в группе больных псориазом, получавших фотохимиотерапию (от 0,00 до 11,9%), наибольший – в группе больных, получавших системную терапию метотрексатом (от 5,7 до 38,9%). При этом значения индекса пролиферации Ki-67, приближающиеся к показателям контрольной группы, от 0 до 10% установлены в первой группе у 12 (80%) больных, во второй у 2 (13,3%) и в третьей у 3 больных (20%). Следовательно, к 21-му дню терапии наибольшим антипролиферативным эффектом обладает фотохимиотерапия.

Экспрессия маркера повреждения ДНК P53 обнаружена в базальном и супрабазальных слоях эпидермиса в исследуемых биоптатах кожи больных псориазом.

При сравнении исходных показателей маркера повреждения ДНК P53 в коже больных псориазом с контрольной группой в среднем по медиане получены статистически значимые различия: в первой группе 0,9% и 0% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$), во второй 1,2% и 0% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$), в третьей 1,4% и 0% соответственно ($U=0,00$; $p=0,000$). Полученные результаты согласуются с данными других авторов [1].

С использованием Т-критерия Вилкоксона установлено достоверное повышение показателей индекса повреждения ДНК P53 (табл. 3) в среднем по медиане в сравнении с исходными значениями: в первой группе 0,9% и 52,5% ($T=3,0$; $p=0,001$), во второй 1,2% и 3,7% ($T=0,00$; $p=0,001$), в третьей 1,4% и 4,0% ($T=5,0$; $p=0,001$). Однако используемый в нашем исследовании клон SPM 514 обнаруживает накопление и дикого, и мутантного белка P53. Поэтому накопление белка P53 может быть обусловлено физиологической реакцией дикого белка P53 на гиперпролиферацию или свидетельствовать о накоплении мутантного P53, связанного с повреждением ДНК [7].

Максимальные значения индекса повреждения ДНК P53 (4,5%) до лечения выявлены с использованием Н-критерия Краскела–Уолиса в группе больных, получавших системную терапию метотрексатом, а минимальные (0,2%) – в группе больных, получавших фотохимиотерапию ($H=10,16$; $p=0,006$). Наименьшая вариабельность показателей маркера повреждения ДНК P53 отмечена в группе больных, получавших фотохимиотерапию (от 0,2 до 1,6%), наибольшая – в группе больных, получавших системную терапию метотрексатом (от 0,8 до 4,5%). В среднем по медиане индекс повреждения ДНК P53 после лечения составляет в первой группе 52,5%, во второй 3,7% и в третьей 4,0% ($H=8,64$; $p=0,013$). Максимальные и минимальные значения зарегистрированы в группе больных, получавших фотохимиотерапию: 87,5 и 0,0%. Наименьший размах показателей установлен в группе больных псориазом, получавших узкополосную 311 нм фототерапию (от 1,5 до 8,3%), наибольший – в группе больных, получавших фотохимиотерапию (от 0,0 до 87,5%). Такой размах показателей в группе больных, получавших фотохимиотерапию, связан, видимо, с комбинированным эффектом терапии. Уменьшение процента P53 позитивных клеток в эпидермисе может объясняться снижением пролиферативной активности и свидетельствовать о полном регрессе псориазных высыпаний. Увеличение уровня экспрессии маркера повреждения ДНК может являться индикатором эффективности фотохимиотерапии. Повышение уровня экспрессии белка P53 связано с основным механизмом фотохимиотерапии, заключающимся во взаимодействии активированного фотосенсибилизатора с ДНК клеток, в результате чего формируются перекрестные сшивки

между цепями ДНК, подавляется синтез нуклеиновых кислот и тормозится клеточная пролиферация [19]. Однако повышение экспрессии белка P53 после фотохимиотерапии может быть обусловлено и повреждением клеточной ДНК. При этом значения индекса повреждения ДНК P53 после терапии, приближающиеся к показателям контрольной группы, от 0 до 0,2% установлены в первой группе у 2 (13,3%) больных, во второй и в третьей группах не зарегистрированы. Таким образом, накопление P53 на фоне проводимой терапии является защитной функцией белка для поддержания гомеостаза кожи путем влияния на процесс гликолиза и регуляции роста клеток, а при фотохимиотерапии связано с основным механизмом и может служить одним из критериев эффективности проводимой терапии. Эти данные свидетельствуют о безопасности фототерапии и системной терапии метотрексатом при соблюдении медицинской технологии.

Мембранная и цитоплазматическая экспрессия белка – транспортера глюкозы в клетку GLUT-1 обнаружена у больных псориазом преимущественно в базальном и шиповатом слоях эпидермиса.

Непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна–Уитни выявлено статистически значимое повышение исходных значений маркера метаболической активности GLUT-1 в среднем по медиане у всех больных псориазом в сравнении с контрольной группой: в первой группе 11 и 6 баллов ($U=00,0$; $p=0,000$), во второй 10 и 6 баллов ($U=0,00$; $p=0,000$), в третьей 10 и 6 баллов ($U=0,00$; $p=0,000$). Повышение уровня экспрессии GLUT-1 указывает на высокую интенсивность метаболизма глюкозы, что способствует пролиферации кератиноцитов. Это свойственно быстро пролиферирующим клеткам, так как глюкоза для них является основным источником энергии [13, 18]. Таким образом, прогрессирующая стадия псориаза характеризуется повышением активности метаболизма глюкозы, а нормальному эпидермису свойственна низкая интенсивность процессов метаболизма глюкозы.

Установлено статистически значимое снижение показателей экспрессии белка – переносчика глюкозы GLUT-1 непараметрическим методом с использованием T-критерия Вилкоксона (табл. 3) в среднем по медиане в сравнении с исходными значениями: в первой группе 11 и 8 баллов ($T=0,00$; $p=0,000$), во второй 10 и 8 баллов ($T=0,00$; $p=0,000$), в третьей 10 и 9 баллов ($T=0,00$; $p=0,002$). Понижение экспрессии GLUT-1 обусловлено снижением интенсивности метаболизма глюкозы и пролиферативной активности клеток эпидермиса. Максимальный уровень экспрессии GLUT-1 (11 баллов) до начала терапии установлен во всех трех группах больных, а минимальный (9 баллов) – в группах больных, получавших узкополосную 311 нм фототерапию и системную терапию метотрексатом ($N=7,48$; $p=0,024$). Наименьшая вариабельность уровня экспрессии маркера метаболической активности

представлена в группе больных, получавших фотохимиотерапию (от 10 до 11 баллов), наибольшая – в группе больных, получавших узкополосную 311 нм фототерапию и системную терапию метотрексатом (от 9 до 11 баллов). В среднем по медиане индекс экспрессии GLUT-1 после терапии составляет в первой и второй группах 8 баллов, в третьей 9 баллов ($H=4,07$; $p=0,131$). Максимальные значения зарегистрированы во всех трех группах (10 баллов), минимальные – в группе больных, получавших фотохимиотерапию (4 балла). Наименьший размах показателей установлен в группах больных, получавших системную терапию метотрексатом (от 8 до 10 баллов) и узкополосную фототерапию 311 нм (от 9 до 11 баллов), наибольший – в группе больных, получавших фотохимиотерапию (от 4 до 10 баллов). Значения индекса GLUT-1, соответствующие показателям интенсивности метаболизма глюкозы нормального эпидермиса от 0 до 6 баллов, установлены в первой группе у 3 (20%) больных, во второй у 1 (6,7%), а третьей не зарегистрированы. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что снижение экспрессии GLUT-1 является благоприятным признаком и свидетельствует об эффективности проводимой терапии.

Установлена статистически значимая прямая связь показателей индекса экспрессии GLUT-1 с количеством клеток в эпидермисе и степенью акантоза методом корреляционного анализа Кендалла.

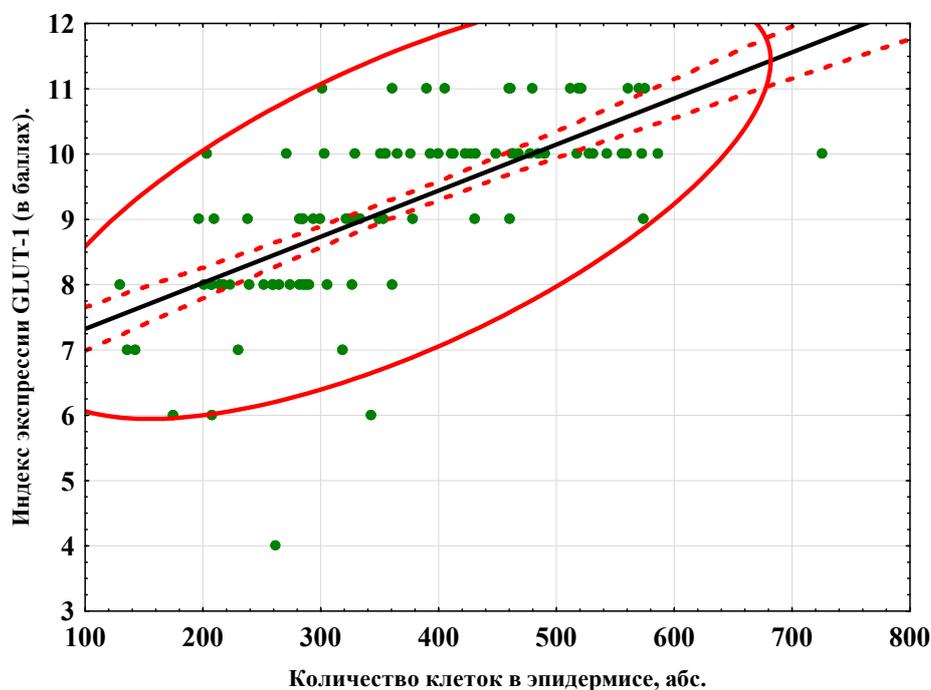


Рис. 2. Корреляционная связь показателей индекса экспрессии GLUT-1 с количеством клеток в эпидермисе ($t = 0,6$; $p = 0,000$)

Чем больше количество клеток в эпидермисе, тем больше индекс экспрессии GLUT-1 (связь положительная, средней силы, коэффициент Кендалла равен 0,6; $p = 0,000$). Следовательно, чем толще эпидермис, тем выше пролиферативная активность клеток, тем больше потребность в глюкозе, тем выше уровень экспрессии GLUT-1. Выявлена статистически значимая сильная положительная связь ($t = 0,7$; $p = 0,000$): с повышением степени акантоза увеличивается индекс метаболической активности. Таким образом, изучение уровня экспрессии GLUT-1, отражающего метаболическую активность пролиферирующего эпидермиса, может использоваться в качестве дополнительного критерия определения тяжести патологического процесса и эффективности проводимой терапии.

Выводы

1. Фототерапия и системная терапия метотрексатом являются безопасными методами лечения и обладают высокой терапевтической эффективностью.
2. Уровень экспрессии маркера GLUT-1 при псориазе отражает возрастающую энергетическую потребность кератиноцитов с наличием прямых корреляционных связей средней силы с количеством клеток в эпидермисе и сильную связь со степенью акантоза, его оценка может рассматриваться в качестве дополнительного критерия определения тяжести патологического процесса и эффективности проводимой терапии.
3. Используемая методика оценки эффективности проводимой терапии при псориазе с помощью маркеров клеточного обновления (Ki-67, P53, GLUT-1) является удобной и может использоваться в практике.

Список литературы

1. Kim S.A., Ryu Y.W., Kwon J.I., Choe M.S., Jung J.W., Cho J.W. Differential expression of cyclin D1, Ki-67, pRb, and p53 in psoriatic skin lesions and normal skin. *Molecular Medicine Reports*. 2018. no. 17. P. 735-742. DOI: 10.3892/mmr.2017.8015
2. Жилова М.Б., Чикин В.В. Клиническая эффективность ротации методов фототерапии (ПУВА-терапия и УФВ-311) у больных со среднетяжелыми формами псориаза // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015. №1. С.67-75.
3. Li Y., Su J., Li F., Chen X., Zhang G. MiR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1 α and VEGFA: Implications for psoriasis treatment. *PLoS ONE*. 2017. vol. 12. no. 4. e0175459. P. 1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0175459.

4. Abdou A.G., Maraee A.H., Eltahmoudy M., El-Aziz R.A. Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and Ki-67 in Chronic Plaque Psoriasis. *The American Journal of Dermatopathology*. 2013. vol. 35. no. 7. P. 731–737. DOI:10.1097/DAD.0b013e3182819da6.
5. Жилова М.Б., Кубанова А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В., Волков И.А., Знаменская Л.Ф., Волнухин В.А. Клинические и молекулярно-генетические исследования эффективности и безопасности применения ультрафиолетового облучения в терапии больных псориазом // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010. №4. С.46-51.
6. Бакулев А.Л. Метотрексат: к вопросу об эффективности и безопасности применения препарата у больных псориазом // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017. №1. С.38-45.
7. Bary Amany, Bary Ahmed. Study of keratinocyte proliferation, apoptosis, and dermal inflammation in psoriatic skin lesions before and after methotrexate therapy: Which change is contributing more to the clinical severity of the disease? *American Journal of Research in Medical Sciences*. 2018. vol. 2. no. 1. P. 34-43. DOI: 10.5455/ajrms.281926.
8. Jesionek-Kupnicka D., Chomiczewska-Skora D., Rotsztejn H. Influence of phototherapy in psoriasis on KI-67 antigen expression: a preliminary study. *Polish Journal of Pathology*. 2013. vol. 64. no. 2. P. 96-103. DOI: 10.5114/PJP.2013.36006.
9. Montazer F., Naraghi Z.S., Mehryan P., Motevalli D. Utility of VEGF, Ki67, and GLUT-1 immunohistochemical markers in differentiating palmoplantar psoriasis from chronic eczematous lesions. *International Journal of Current Research*. 2017. vol. 9. no. 4. P. 48751-48756.
10. Seleit I., Bakry O.A., Al-Sharaky D.R., Ragab R.AA., Al-Shiemy S.A. Evaluation of Hypoxia Inducible Factor-1 α and Glucose Transporter-1 Expression in Non Melanoma Skin Cancer: An Immunohistochemical Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017. vol. 11. no. 6. P. 9-16. DOI: 10.7860/JCDR/2017/25077.10022.
11. Kanjanapan Y., Deb S., Young R.J., Bressel M., Mileshkin L., Rischin D., Hofman M.S., Narayan K., Siva S. Glut-1 expression in small cervical biopsies is prognostic in cervical cancers treated with chemoradiation. *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 2017. vol. 2. P. 53–58. DOI: 10.1016/j.ctro.2017.01.003.
12. Ancey P.B., Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *The FEBS Journal*. 2018. vol. 285. no. 16. P. 2926-2943. DOI:10.1111/febs.14577.
13. Hodeib A.A., Neinaa Y.ME., Zakaria S.S., Alshenawy H.A. Glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in psoriasis: correlation with disease severity. *International Journal of Dermatology*. 2018. vol. 57. no. 8. P. 943-951. DOI: 10.1111/ijd.14037.
14. Ланг Т.А. Сесик М. Как описывать статистику в медицине: руководство для авторов, редакторов и рецензентов. М.: Практическая медицина, 2016. 480 с.

15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2006. 305 с.
16. Гудинова Ж.В., Жернакова Г.Н., Толькова Е.И. Дружелюбная статистика: статистический анализ медицинских баз данных: пошаговые инструкции. Выпуск I. Омск: Изд-во ОмГМА, 2014. 112 с.
17. Zhao P., Wang W., Yang L., Gaole A. The expression and regulation of glucose transporters in tumor cells. *Advances in Modern Oncology Research*. 2016. vol. 2. no. 6. P. 318-322. DOI: 10.18282/amor.v2.i6.127.
18. Houtkooper R. Sweet skin remedy. *Science Translational Medicine*. 2018. vol. 10, Issue 440, eaat8526. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat8526.
19. Жилова М.Б., Бутарева М.М., Волнухин В.А. Современные аспекты фототерапии псориаза // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010. №3. С.27–32.